2000, 21(6)

①

动 物 学 研 究 2000, Dec. 21 (6): 425～431 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

淡水豚类线粒体DNA 12*S* rRNA基因的序列变异及其分子系统学研究

Q959.841

杨 光① 刘 珊 季国庆 周开亚
(南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所 南京 210097)
Ricardo Bastida Laura Rivero
(*Departamento de Ciencias Marinas, Casilla de Correo 43, 7600 Mar del Plata, Argentina*)

摘要: 淡水豚类4个代表属［白暨豚（*Lipotes*）、恒河豚（*Platanista*）、弗西豚（*Pontoporia*）和亚河豚（*Inia*）］mtDNA 12*S* rRNA基因的序列差异水平，高于其他齿鲸类科间的差异，特别是远远高于海豚总科内的科间差异。研究结果支持它们应归属于不同的科，即白暨豚科（Lipotiidae）、恒河豚科（Platanistidae）、弗西豚科（Pontoporidae）和亚河豚科（Iniidae）。恒河豚科是鲸类中最早分化出来的独立支系，而其余3个淡水豚科组成一个单系，作为海豚总科的姊妹群。淡水豚类的发生是多系的。白暨豚科、亚河豚科和弗西豚科是否隶属于同一个总科尚需进一步研究。

关键词: 淡水豚类; 12*S* rRNA; 分子系统学 分类
中图分类号: Q959.841 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254－5853(2000)06－0425－07

长期以来，有关淡水豚类分类和系统发生的争论一直持续不断。争论的焦点主要包括淡水豚类是单系还是多系（Zhou, 1982），以及淡水豚类不同类群科级和总科级阶元的划分（详见杨光等, 1999）。杨光等（1999）通过线粒体DNA（mitochondrial DNA, mtDNA）细胞色素b（cytochrome b, cyt b）基因部分序列的研究第1次为淡水豚类4个属分别隶属于不同的科，特别是白暨豚科的建立（周开亚等, 1979）提供了DNA分子水平的证据，并通过系统发生分析，指出淡水豚类是一个并系的类群。但杨光等②根据cyt b基因的全序列进行的系统发生分析，并没有很好地解决淡水豚类不同类群间的系统发生问题。虽然cyt b基因全序列的研究也支持淡水豚类不是单系的观点，但邻接法（neighbor-joining method, NJ）和最大简约法（maximum parsimony, MP）所得到的系统树的拓扑结构却有所不同。因此，有必要使用新的基因片段来研究这一问题。

本文测定了白暨豚（*Lipotes vexillifer*）、恒河豚（*Platanista gangetica*）和弗西豚（*Pontoporia blainvillei*）mtDNA 12*S* rRNA基因的序列，与已发表的亚河豚（*Inia geoffrensis*）及其他鲸类的相应序列合并，分析现生淡水豚类的系统发生关系。

1 材料和方法

本研究共测定6头淡水豚个体mtDNA 12*S* rRNA基因的部分序列，其中白暨豚2头（NJNU 359和NJNU388），取自长江中下游被船只误伤致死的个体；恒河豚2头（NJNJ384和NJNU385），取自孟加拉国达卡附近的Ganges-Brahmaputra河支流中误捕致死的个体；弗西豚2头（NJNU409和NJNU410），取自阿根廷的沿岸水域被渔业误捕致死的个体。所有个体的DNA提取均以骨骼肌为材料，其中白暨豚为－20℃冷冻保存的肌肉标本，恒河豚和弗西豚的肌肉标本则分别由盐饱和的20%二甲基亚砜（DMSO）和95%乙醇常温保存，带回本研究所后再－20℃冷冻保存。

用SDS变性、蛋白酶K消化和酚-氯仿抽提的

收稿日期: 2000－04－11; 修改稿收到日期: 2000－08－07
基金项目: 国家自然科学基金重大项目（39899400）子课题及江苏省教委自然科学基金（JW970122）资助项目
①通讯作者, E－mail: *gyang@njnu.edu.cn*
②未发表资料

方法提取总 DNA，具体操作参照 Sambrook 等（1989）。恒河豚和弗西豚的肌肉标本在用于 DNA 提取之前用清水彻底清洗，以去除其中的盐和 DMSO 或乙醇。用于 12*S* rRNA 基因扩增的引物分别为 L1091 和 H1478（Kocher 等，1989）。聚合酶链式反应在 PE2400（Perkin Elmers）或 PTC-200 型（MJ Research）PCR 仪上进行。循环参数为：95℃预变性 4 min，然后进入如下循环：95℃ 40 s，52℃30 s，72℃2 min，循环 35 次。循环结束后在 72℃延伸 7 min，然后于 4℃保存。PCR 产物经纯化后在 ABI310 型遗传分析仪（Perkin Elmers）上进行序列测定，具体方法参见相应的用户操作手册。

用 Clustal X 软件（Thompson 等，1997）进行序列的对位排列，并辅以人工校对。用 MEGA 软件（Kumar 等，1993）计算淡水不同属间，以及其他齿鲸类不同科的代表种间的碱基替代（转换＋颠换）和颠换的百分率；用 MEGA 软件中基于 Kimura-双参数模型的 NJ 法和 PAUP ver 3.1.1 软件（Sworfford，1993）中的 MP 法重建了包括现生鲸类为主要代表类群的系统发生树。构树时以牛（*Bos taurus*）等 7 种有蹄类的相应序列作外类群。

2 结 果

2.1 淡水豚类 12*S* rRNA 基因的序列变异及其与其他齿鲸类科间变异水平的比较

用于分析的白暨豚、恒河豚和弗西豚的 12*S* rRNA 基因的序列长度分别为 387、389 和 385 bp（图 1），其中包括 85 个变异位点和 16 个简约信息位点。但通过与其他鲸类以及外类群的同源序列进行对位排列后用于分析的实际片段长度为 395 bp，包括 160 个变异位点和 121 个简约信息位点。

从表 1 可知，白暨豚、恒河豚、亚河豚和弗西豚（分别代表现生淡水豚类的 4 个属）之间的序列差异（转换＋颠换）在 9.46%～14.32%，平均为（12.02±1.85）%。而其他齿鲸类科间的序列差异则为 3.78%～11.89%，平均为（8.31±2.24）%。显然，淡水豚类不同属间的差异要高于其他齿鲸类科间的差异水平，特别是远远高于海豚总科下 3 个科（海豚科、鼠豚科和一角鲸科）之间的差异[3.78%～5.68%，平均（4.68±0.95）%]。再从颠换的百分率来看，齿鲸类科间的差异最低的是海豚总科下的 3 个科，如海豚科与鼠豚科仅 0～0.54%，平均（0.36±0.31）%，小于淡水豚类不同属间差异［1.89%～5.68%，平均（4.23±1.43）%］的 1/10。因此，对于把 4 个淡水豚属分别归入不同的科，即白暨豚科（Lipotiidae）、恒河豚科（Platanistidae）、亚河豚科（Iniidae）和弗西豚科（Pontoporidae）的观点，12*S* rRNA 基因的序列分析结果再一次提供了佐证。

2.2 淡水豚类的系统发生

图 2 和图 3 分别是根据淡水豚类和除小真鲸科外其他鲸类科的代表种的 mtDNA 12*S* rRNA 基因序列，以牛等7种有蹄类作外类群，用NJ法和MP法重建的系统发生树。在NJ树（图2）中，海豚总科、喙鲸总科、抹香鲸总科和须鲸亚目，以及所有的科级分类单元均组成单系的进化支系，这与传统的鲸类分类学是吻合的。淡水豚类可分成2组，但2个

表 1 淡水豚类 4 个属间及与其他齿鲸类科的代表种间的序列差异百分率（对角线以上）和颠换百分比（对角线以下）

Table 1 Percent difference of base substitution (below diagonal) and transversions only (above diaganol) among river dolphins and representatives of other odontocete families

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 白暨豚（*Lipotes vexillifer*）		3.24	5.68	4.59	2.70	2.70	2.70	3.51	4.32	4.05
2 亚河豚（*Inia geoffrensis*）	10.54		4.59	1.89	2.16	2.16	2.16	2.43	2.70	2.97
3 恒河豚（*Platanista gangetica*）	11.89	14.32		5.41	3.51	3.51	3.51	2.70	2.43	2.16
4 弗西豚（*Pontoporia blainvilei*）	12.16	9.46	13.78		3.51	3.51	3.51	3.78	4.59	4.32
5 瓶鼻海豚（海豚科）（*Tursiops truncatus*）（Delphinidae）	10.00	11.35	9.73	10.81		0.00	0.54	2.43	2.16	1.89
6 港湾鼠豚（鼠豚科）（*Phocoena phocoena*）（Phocoenidae）	8.65	10.54	10.27	9.19	3.78		0.54	2.43	2.16	1.89
7 白鲸（*Delphinapterus leucas*）（Monodontidae）	8.92	10.27	10.00	10.00	5.68	4.59		2.43	2.16	1.89
8 柯氏喙豚（*Ziphius cavirostris*）（Ziphiidae）	11.35	11.08	10.54	12.70	11.89	9.73	10.00		1.35	1.08
9 抹香鲸（*Physeter macrocephalus*）（Physeteridae）	9.73	12.16	8.38	11.89	10.00	8.38	8.38	8.11		0.81
10 小抹香鲸（*Kogia breviostris*）（Kogiidae）	11.62	12.97	10.54	13.51	9.46	9.46	8.92	9.73	6.49	

```
Lvexi TCGTAAACA- AAGTCGTCCT GAAACAAGAC TATTCGCCAG AGTACTACCG GCAACAGCCC AAAACTCAAA GGACTTGGCG

Pgang G.CA....CC .GA.AA..AC A.......T .......... ........TA ........TT .......... ..........

Pblai ...A....CC ..T.G..-TA AT........ C-........ .......... .........T .......... A.........
                                                                                            160
Lvexi GTGCTTCATA TCCTTCTAGA GGAGCCTGTT CTATAAACGA TAAACCCCGA TCAACCTCAC -CAACCCTTG CTACTTCAGT

Pgang .......... ...C...... .......... ......T... .......... .......... A......... ..........

Pblai ........C. .......... .......... .......... .......... .A........ .....T.... ..........
                                                                                            240
Lvexi CTATATACCG CCATCTTCAG CAAACCCTAA TGAAGGCACA AAAGTAAGCA CAATTATTAT ACATAAAAAC GTTAGGTCAA

Pgang .......... .......... .......C.G .A.G..A..G .C........ ...C..C.T. ..G....... ..........

Pblai .......... ......CA.. .......... -A....A.TG .......... ...C...CTC T..C...... ..........
                                                                                            320
Lvexi GGTGTAACTC ATGAGTTGGG AAGTAATGGG CTACATTTTC TACAGCAAG- AATACCACTT ATAAACCACA CGAAAGTTTT

Pgang ........CT ...G.A.... ...A...... .......... ....CT...A .TAC-.C... TAT.C.T.A. ..........

Pblai ........CT ...G.....A ...A...... .......... ..T.A..... ..C.T.-..C .....TG.T. ..........

                                                                                 390
Lvexi TATGAAACCT AAAAACCAAA GGAGGATTAA GCAGTAAATT AAGACTAGAG CGCTTAATTG AATTAGGCCA

Pgang .......TA. .......... ........T. .......... ....A..... .......... ...A......

Pblai .......... ......T... ........T. ........C. ....A..... T.....T... ..CA......
```

图 1　白暨豚和恒河豚线粒体 DNA 12S rRNA 基因的序列

Fig.1　DNA sequences of mitochondrial 12S rRNA gene of Baiji (Lvexi), Ganges river dolphins (Pgang), and La Plata dolphins (Pblai)

·表示与白暨豚有相同的碱基组成 [dot (·) indicates where the Ganges or La Plata has an identical base with Baiji]。

组之间并没有姊妹关系。由恒河豚（科）单独组成的一支是鲸类系统树中最基部的分支，作为其他鲸类（包括须鲸类和其他齿鲸类）的姊妹群（虽然支持这一关系的自举检验值仅 35）。在由其余 3 个淡水豚科（白暨豚科、亚河豚科和弗西豚科）组成另一组中，亚河豚科与弗西豚科的关系较近（自举检验值 79）。这 3 个科组成的一支与由海豚科、鼠豚科和一角鲸科组成的单系具有姊妹关系。

图 3 是通过 MP 法，赋予颠换 2 倍于转换的权值后得到的 50%多数一致树（50% majority consensus tree），树长（tree length）为 545。该系统树在两个方面与 NJ 树（图 2）是一致的：①恒河豚类是鲸类中最早分化出来的一支，它与另外 3 个淡水豚科间没有直接的亲缘关系，因而支持淡水豚类是多系发生的观点；②海豚总科及其 3 个科均分别组成单系的进化支系；白暨豚、亚河豚和弗西豚与海豚总科共同组成一支。此外，在 MP 树中，抹香鲸科、小抹香鲸科、鹅喙鲸属、中喙鲸属和须鲸亚目分别组成一支。

3　讨　论

淡水豚类mtDNA 12S rRNA基因序列的变异水平的分析结果与cytb基因的分析结果（杨光等，1999；Yang等，1999）十分吻合，均揭示现生淡水豚类的 4 个属之间已经出现了极为显著的遗传分化，他们之间的差异已显著超过了其他齿鲸类所有科间的差异水平，为归属于不同的科的观点提供了更加有力的支持。再从序列的转换/颠换比值来看，淡水豚不同属间的转换/颠换比的最低值在白暨豚和恒河豚之间，仅1.0952，最高值则在亚河豚和

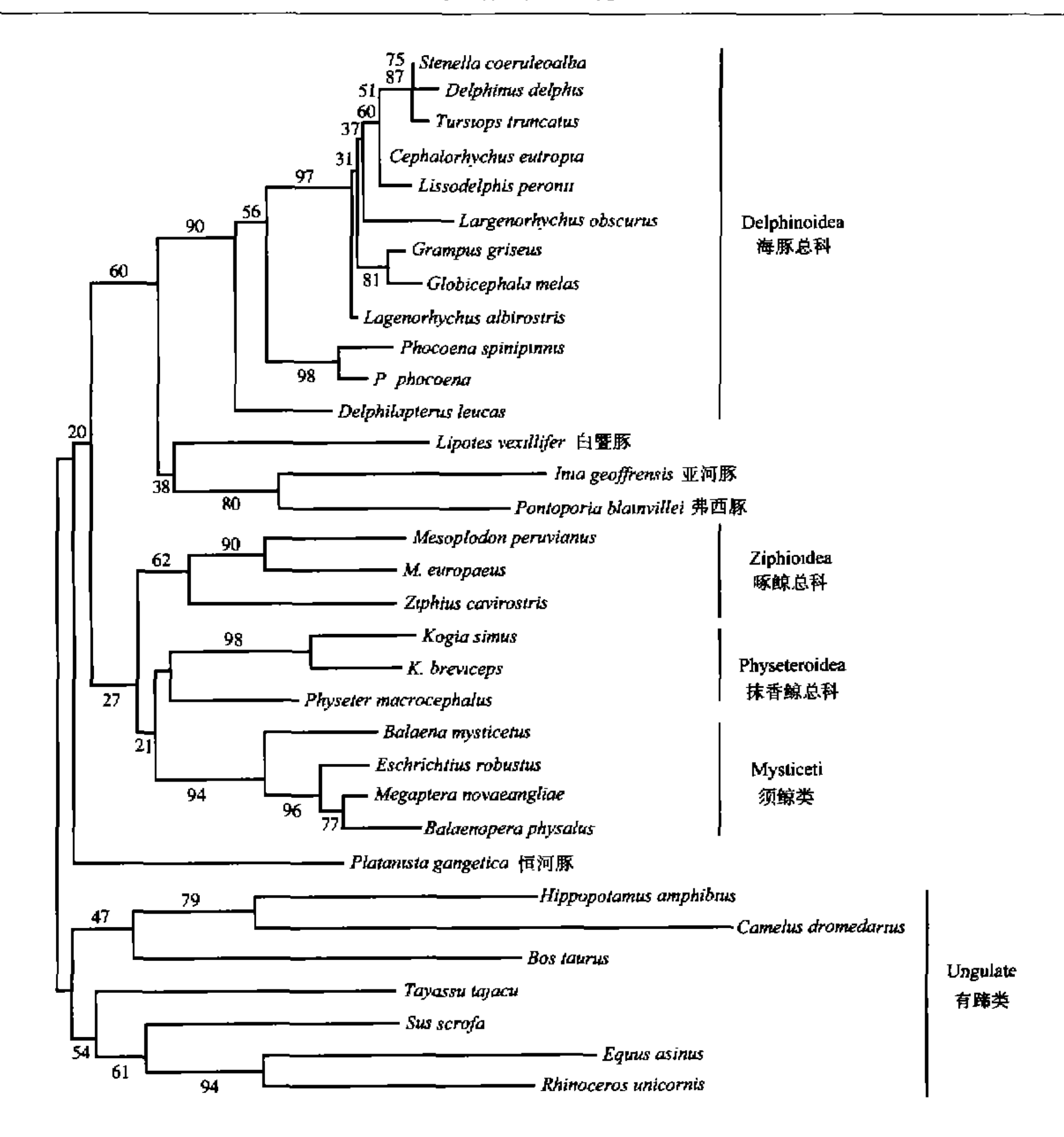


图 2　26 种鲸类 cyt b 基因片段的 NJ 树

Fig.2　Phylogenetic tree inferred from mitochondrial 12*S* rRNA gene sequences of 26 cetaceans using neighbor joining method with Kimura 2-parameter distance

构树时以 7 种有蹄类为外类群。树枝上方的数字为自举检验值来自于 500 次重复运算的结果［sequence of seven ungulates were used as outgroups. Bootstrap percentages derived from 500 replications were indicated above branches］。

弗西豚之间，为 4，而海豚总科下 3 个科间的转换/颠换比最低的也达 7.5（其中海豚科和鼠豚科的 2 个代表种之间的 15 个序列变异位点全为转换而无颠换），抹香鲸总科下抹香鲸科和小抹香鲸科的转换/颠换比为 7。淡水豚类具有的相对较高的序列饱和程度，也在一定程度上说明淡水豚类不同类群间的分化程度要高于海豚总科下的科间的分化程度。因此，上述结果为白暨豚科的建立（周开亚等，1979）和淡水豚不同类群分属于不同科（de Muizon，1988）的观点提供了DNA水平的又一证据。虽然本次研究没有包括印河豚，但由于印河豚与恒河豚之间的差异极小，cyt b 基因序列分析（杨光等，1999）也不支持把它作为 1 个独立的物种。Rice（1998）也只承认恒河豚（*Platansita gangetica*），而把印河豚作为恒河豚的1个亚种 *P. g. minor*。因此，缺少印河豚不会对本文的分析（包括系统发生分析）造成影响。

杨光等（1999）根据cyt b基因部分序列的系

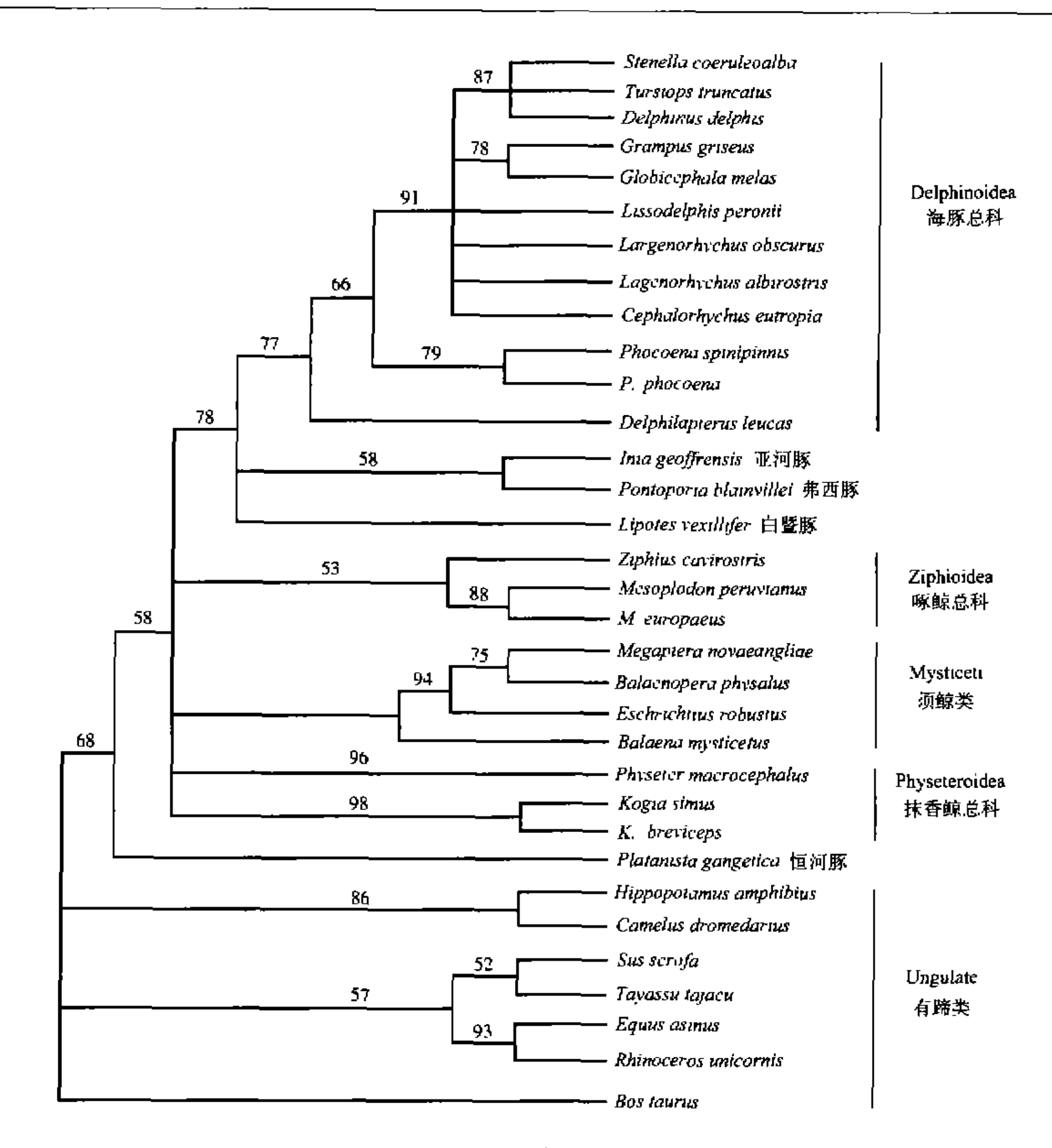


图 3 26 种鲸类 cyt b 基因片段的 MP 树（构树时以 7 种有蹄类为外类群）

Fig.3 Majority-rule bootstrap consensus tree (heuristic search, maximum parsimony, 500 replicates) based on mitochondrial 12*S* rRNA gene sequences of 26 cetaceans, using seven ungulates as outgroups

统发生分析，认为淡水豚类不是一个单系的类群，其发生应是并系的；但随后用 cyt b 基因全序列的系统发生分析（Yang 等，1999）后认为是多系的。从本文的 12*S* rRNA 基因的系统发生分析来看，不论是 NJ 树还是 MP 树，恒河豚均组成鲸类系统树中最基部的分支，作为其他鲸类的姊妹群，而淡水豚类的另外 3 个科则与海豚总科有较近的亲缘关系。鉴于此，我们认为，淡水豚类的发生应是多系的。

在白鱀豚科、亚河豚科和弗西豚科组成的一支中，后两者具有明显较近的亲缘关系。不仅在所有的系统树中，两者聚为一支；而且淡水豚不同科间的序列转换/颠换比也是后两者之间最高，同样提示两者之间有相对较小序列饱和程度和遗传分化程度。但在 MP 树中，白鱀豚科和亚河豚科 + 弗西豚科之间，以及它们与海豚总科之间的系统发生关系并没有体现出来，其他如抹香鲸科、小抹香鲸科、鹅喙鲸属、中喙鲸属和须鲸亚目等 5 个支系间的系统发生关系同样也没有体现，这很可能与本研究所使用的片段较短，相应地简约信息位点数较少有关。因此，在今后的研究中增加序列的长度以增加序列变异位点数，特别是简约信息位点数，将是十

分必要的。

基于本文的分析结果，恒河豚类具有极为特殊的发生地位，应作为其他鲸类的姊妹群；结合图2和图3所揭示的鲸类不同类群的系统发生关系，支持Milinkovitch等（1994）齿鲸类的发生是多系的观点。由于齿鲸类并不组成与须鲸类具有姊妹关系的单系群，因此，我们认为，以须鲸类作外类群，对齿鲸类进行系统发生分析处理（Arnason等，1996）是不够恰当的。同时，由于淡水豚类并不组成一个单系的进化支系，传统上将其归属于一个科或总科的观点也难以立足。鉴于恒河豚类独特的系统发生地位，将其独立为恒河豚总科是合理的。从NJ树来看，白暨豚科、亚河豚科和弗西豚科组成一个单系的分支，作为海豚总科的姊妹群。如果依据支序分类学的观点，即姊妹群应具有相同的分类等级，则倾向于将这3个科合并为1个总科级的支系。但从遗传距离来看，它们之间的差异均已达到其他齿鲸类总科间的差异水平，又倾向于把它们归入不同的总科。另一方面，在MP树（图3）中，海豚总科、白暨豚科和亚河豚+弗西豚科之间的系统发生关系并没有体现出来。如果白暨豚科和亚河豚+弗西豚科聚为一支后再与海豚总科聚类，与NJ树（图2）的结果相似，则可以作为三者合并为一个总科的证据。但如果3个淡水豚科并不先组成一个单系，再与海豚总科聚类，则可能成为支持de Muizon（1988）的观点的依据，即把白暨豚归入白暨豚总科（Lipotoidea），而把亚河豚和弗西豚归入亚河豚总科（Inioidea）。对这个问题，我们将作进一步的研究。此外，由于上述3科与海豚总科共同组成一个单系的支系，因而又成为支持另一观点的依据——把它们归属于海豚下目（Delphinida）（Arnason等，1996；de Muizon，1988）。

从图2来看，海豚总科的3个科中，一角鲸科是最基部的分支，为鼠豚科+海豚科的姊妹群。支持一角鲸科与鼠豚科+海豚科以及鼠豚科和海豚科的分化的自举检验值较高，分别为93和64。这一结果明显比杨光等（1999）的系统发生分析结果更合乎情理。但这一系统发生关系是否会因为外类群和内类群，以及基因片段的改变而改变，则有待于进一步验证。

致　谢　本文插图由徐信荣先生绘制，谨致谢意！

参考文献

杨　光，周开亚，1999. 淡水豚类分子系统发生的研究[J]. 兽类学报，**19**(1)：1～9. [Yang G, Zhou K Y, 1999. A study on the molecular phylogeny of river dolphins. *Acta Theriologica Sinica*, **19**(1)：1－9.]

周开亚，钱伟娟，李悦民，1979. 白暨豚的骨骼和分类位置[J]. 动物学报，**25**(1)：58～73. [Zhou K Y, Qian W J, Li Y M, 1979. The osteology and the systematic position of the baiji, *Lipotes vexillifer*. *Acta Zoologica Sinica*, **25**(1)：58－73.]

Arnason U, Gullberg A, 1996. Cytochrome b nucleotide sequences and the identification of five primary lineages of extant cetaceans[J]. *Mol. Biol. Evol.*, **13**(2)：407－417.

Kocher T D, Thomas W K, Meyer A *et al*, 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: amplification and sequencing with conserved primers[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **86**：6196－6200.

Kumar S, Tamura K, Nei M, 1993. MEGA: molecular evolutionary genetic analysis, ver 1.01[CP]. The Pennsylvania State University, University Park. 1－130.

Milinkovitch M C, Meyer A, Powell J R, 1994. Phylogeny of all major groups of cetaceans based on DNA sequences from three mitochondrial genes[J]. *Mol. Biol. Evol.*, **11**(6)：939－948.

de Muizon C, 1988. Les relations phylogenetigues des Delphinida (Cetacea, Mammalia)[J]. *Annales de Paleontologie* (Vert-Invert), 74(4)：159－227.

Rice D W, 1998. Marine mammals of the world: Systematics and distribution. [M]. Special publication No. 4. The Society for Marine Mammalogy. Lawrence K S.

Sambrook J E, Fitch F, Maniatis T, 1989. Molecular cloning, a laboratory manual (2nd edition)[M]. USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1－1062.

Sworfford D L, 1993. Phylogenetic analysis using parsimony. version 3.1.1[CP]. Illinois Natural History Survey, Champaign.

Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, **24**：4876－4882.

Yang G, Zhou K, 1999. Molecular systematics of river dolphins inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences[A]. In: Abstract of 13th Biennial Hawaii: Conference on the Biology of Marine Mammals, Maui[C]. 205.

Zhou K, 1982. Classification and phylogeny of the superfamily Platanistoidea, with notes on evidence of the monophyly of the Cetacea[J]. *Sci. Rep. Whales. Res. Inst.*, **34**：93－108.

SEQUENCE VARIATION OF MITOCHONDRIAL 12*S* rRNA GENE AND INFERRED MOLECULAR SYSTEMATICS OF RIVER DOLPHINS

YANG Guang　LIU Shan　JI Guo-Qing　ZHOU Kai-Ya
(*Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, P.R. China*)
Ricardo Bastida　Laura Rivero
(*Departamento de Ciencias Marinas, Casilla de Correo 43, 7600 Mar del Plata, Argentina*)

Abstract: Partial DNA sequences of mitochondrial 12*S* rRNA gene from *Lipotes vexillifer*, *Platanista gangetica*, and *Pontoporia blainvillei*, were amplified and determined to address the systematics of river dolphins. The sequence divergence among different genera of river dolphins, estimated either by transition + transversion or transversion only, is greater than those among other odontocete families, far greater than those among families Delphinidae, Monodontidae, and Phocoenidae within superfamily Delphinoidea. Thus, the river dolphin genera should be referred into different families, i.e. Lipotidae, Platanistidae, Iniidae, and Pontoporiidae. The phylogenetic analysis by using neighbor-joining method (NJ) and maximum parsimony method (MP) suggested that the Platanistidae was the earliest divergent clade in the cetaceans, whereas the other three river dolphin families constituted a monophyletic group having sister relationship with Delphinoidea. The phylogeny of river dolphins should be polyphyletic, rather than monophyletic or paraphyletic. The Platanistidae should be referred into a separated superfamily Platanistoidea, whereas the superfamily classification of other three river dolphin families should be further studied.

Key words: River dolphins; 12*S* rRNA; Molecular systemaitcs

书 讯

《法医昆虫学》出版

《法医昆虫学》是一门新兴的交叉学科，它将昆虫学证据应用于司法实践中，在刑事案件侦破和法庭审判中起着不可低估的作用。本书是重要的缺门专著，作者依据国内外文献资料和博士阶段的研究成果编著而成。全书共分 12 章，系统地介绍了法医昆虫学的理论基础、研究方法及多种新技术的应用。对具有法医学意义的双翅目、鞘翅目、鳞翅目和膜翅目等昆虫的形态特征、生活习性与演替规律作了详细叙述，并列举了 48 件案例说明其具体应用。

读者对象：法医学工作者，公检法部门技术人员，昆虫学、高等院校有关专业师生。本书印数有限，欲购从速。

本书由胡萃、王江峰、闵建雄等编著。16 开 550 千字，403 页。精装定价：48.00 元。2000 年 10 月出版。ISBN7－5366－4948－7。

联系地址：广州市中山二路 74 号中山医科大学法医学系 5 楼分子病理室及法医昆虫学实验室

邮编：510080

电话：020－87331950，198－18062090

E-mail：wifwif@gzsums.edu.cn

联系人：王江峰

王江峰
（中山医科大学法医学系　510080）